

(Translation)

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of the
following application as filed with this Office.

Date of Application:

September 30, 1998

Application Number:

Japanese Patent Application
No. 278579/1998

Applicant(s):

Nippon Shokubai Co., Ltd.

Commissioner,
Patent Office

August 31, 1999

Takeshi Isayama (seal)

Certificate No. 11-3061366



日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1 9 9 8 年 9 月 3 0 日

出 願 番 号
Application Number:

平成 1 0 年 特 許 願 第 2 7 8 5 7 9 号

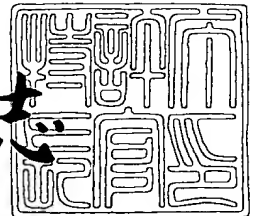
出 願 人
Applicant (s):

株式会社日本触媒

1 9 9 9 年 8 月 3 1 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

伴 佐 山 建 志



出証番号 出証特平 1 1 - 3 0 6 1 3 6 6

【書類名】 特許願

【整理番号】 P98-0553

【提出日】 平成10年 9月30日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12P 7/44

【発明の名称】 L-アスパラギン酸の製造方法

【請求項の数】 4

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番地12 株式会社日本触媒内

 【氏名】 向山 正治

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番地12 株式会社日本触媒内

 【氏名】 安田 信三

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番地12 株式会社日本触媒内

 【氏名】 小松崎 聡美

【特許出願人】

 【識別番号】 000004628

 【氏名又は名称】 株式会社 日本触媒

【代理人】

 【識別番号】 100091096

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

 【識別番号】 100096183

 【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 貞次

【選任した代理人】

【識別番号】 100101904

【弁理士】

【氏名又は名称】 島村 直己

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9406568

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 L-アスパラギン酸の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 フマル酸アンモニウム塩溶液にアスパルターゼを作用させてL-アスパラギン酸アンモニウム塩溶液を得、該溶液からL-アスパラギン酸を結晶化してなるL-アスパラギン酸の製造方法において、前記L-アスパラギン酸アンモニウム塩溶液を50～130℃に加温後、該溶液に含まれるL-アスパラギン酸に対して0.4～0.8倍モルのフマル酸を添加し、せん断力をかけることによって一旦均質溶液とすることを特徴とするL-アスパラギン酸の製造方法。

【請求項2】 析出したL-アスパラギン酸を分離する際のL-アスパラギン酸結晶含有懸濁液の温度が25～50℃の範囲である請求項1に記載のL-アスパラギン酸の製造方法。

【請求項3】 前記均質溶液を50～130℃の温度で0.1秒～1時間保持することを特徴とする請求項1又は2に記載のL-アスパラギン酸の製造方法。

【請求項4】 水分を含んだフマル酸結晶とL-アスパラギン酸アンモニウム塩溶液を連続的に混合することを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載のL-アスパラギン酸の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はアスパルターゼを用いてフマル酸から結晶性のL-アスパラギン酸を製造する方法に関する。

【0002】

【従来技術】

D, L-アスパラギン酸2ナトリウム塩溶液にフマル酸を添加してD, L-アスパラギン酸を析出回収する方法が特開昭48-56618号公報に開示されている。この方法では、フマル酸2ナトリウムと大過剰のアンモニアを化学的に反

応させてD, L-アスパラギン酸を生成させ、過剰のアンモニアを追い出した後、フマル酸を添加することによってD, L-アスパラギン酸を析出させて分離している。

この場合、フマル酸を添加する前の溶液はD, L-アスパラギン酸ナトリウムであり、これにフマル酸を添加し、D, L-アスパラギン酸を分離した濾液はフマル酸2ナトリウムとなっている。この濾液にフマル酸に対して大過剰のアンモニアを追加して次の反応を行うことが開示されている。

【0003】

通常、L-アスパラギン酸をフマル酸アンモニウムから酵素を用いて製造する場合、原料であるフマル酸に対して1倍モル以上のアンモニアが必要であり、反応の平衡をL-アスパラギン酸に片寄らせるために通常2～2.3倍モルのアンモニアが用いられている。またこの反応を触媒する酵素であるアスパルターゼの至適pHは8.3付近であり、このpHよりあまりに高いpH範囲では酵素活性が低下したり、酵素活性の劣化の問題が生じてくる。特開昭48-56618号公報の方法ではフマル酸2ナトリウム溶液に大過剰のアンモニアを追加して次の反応に用いているが、アンモニアをアスパルターゼの酵素反応に用いる場合にはアンモニアを大過剰に用いることはできない。

【0004】

フマル酸2ナトリウムのpHは8.4であるが、これに1倍モルのアンモニアを追加した溶液は、30℃でpH12.1であり、アスパルターゼが変性してしまう。したがってアスパルターゼによる酵素反応にはアンモニアを使用することができない。

また、特許第2524306号公報においては、L-アスパラギン酸モノアンモニウム溶液にフマル酸を添加してL-アスパラギン酸を析出回収する方法が開示されている。そしてこの方法には、フマル酸2アンモニウム塩溶液をアスパルターゼの作用によってL-アスパラギン酸モノアンモニウム塩溶液とした後に、フマル酸を添加して、L-アスパラギン酸を析出させ、分離し、結晶を分離した後の濾液にアンモニアを追加して次の反応に再使用することが示されている。

【0005】

この方法ではL-アスパラギン酸モノアンモニウム塩溶液にフマル酸を添加することによって、L-アスパラギン酸とフマル酸の塩交換反応を、フマル酸若しくはL-アスパラギン酸のどちらか一方又は両方の結晶が常に存在する不均一条件下で行っている。この方法では、フマル酸の溶解とL-アスパラギン酸の結晶析出が同時に起こるため、L-アスパラギン酸が結晶として析出する際に、未溶解のフマル酸結晶を核として結晶成長し、これによって得られるL-アスパラギン酸にフマル酸が混入して純度が低下するという問題があった。しかも、結晶核としてフマル酸が混入するため、結晶を再度懸濁するなどの洗浄操作を行っても、混入したフマル酸を効果的に除くことができない。また、この方法で析出させた結晶は、数 μm の大きさの微小であるため、取り扱いが困難である。

【0006】

以上のように、L-アスパラギン酸のアンモニウム塩にフマル酸を添加してL-アスパラギン酸を晶析させる方法においては、完全に均質な溶液とした後、L-アスパラギン酸の結晶を析出させる効果的な方法は見出されていなかった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、上記のような問題点を解決し、アスパルターゼを用いる、より純度の高い結晶性のL-アスパラギン酸を製造する方法を提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】

上記の問題を解決すべく鋭意検討を行った結果、あらかじめ加温したL-アスパラギン酸アンモニウム塩溶液にフマル酸を添加して一旦均質に溶解し、その後L-アスパラギン酸を析出させると、得られるL-アスパラギン酸結晶の純度が高くなることがわかった。

【0009】

すなわち、フマル酸アンモニウム塩溶液をアスパルターゼの作用によってL-アスパラギン酸アンモニウム塩溶液とし、この溶液を50～130℃に加熱した

ところに、この溶液中に含まれる L-アスパラギン酸に対して 0.4~0.8 倍モルのフマル酸を添加、攪拌すると、すぐに溶解して結晶が存在しない均質な溶液を得ることができる。この一旦均質となった溶液を放置又は冷却すると、L-アスパラギン酸の結晶のみを析出させることができ、また、結晶の形状も平均 100~1000 μm の長さの針状結晶にすることができることを見出した。

【0010】

このように、L-アスパラギン酸アンモニウム塩溶液をあらかじめ加温しておけば、フマル酸がすぐに溶解し均質溶液にすることができるため、フマル酸結晶が L-アスパラギン酸に混入してくるのを防ぐことができる。

以上のような方法により、純度の高い L-アスパラギン酸結晶を得ることができることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

【0011】

(1) フマル酸アンモニウム塩溶液にアスパルターゼを作用させて L-アスパラギン酸アンモニウム塩溶液を得、該溶液から L-アスパラギン酸を結晶化してなる L-アスパラギン酸の製造方法において、前記 L-アスパラギン酸アンモニウム塩溶液を 50~130℃ に加温後、該溶液に含まれる L-アスパラギン酸に対して 0.4~0.8 倍モルのフマル酸を添加し、せん断力をかけることによって一旦均質溶液とすることを特徴とする L-アスパラギン酸の製造方法。

(2) 析出した L-アスパラギン酸を分離する際の L-アスパラギン酸結晶含有懸濁液の温度が 25~50℃ の範囲である (1) に記載の L-アスパラギン酸の製造方法。

【0012】

(3) 前記均質溶液を 50~130℃ の温度で 0.1 秒~1 時間保持することを特徴とする (1) 又は (2) に記載の L-アスパラギン酸の製造方法。

(4) 水分を含んだフマル酸結晶と L-アスパラギン酸アンモニウム塩溶液を連続的に混合することを特徴とする (1)~(3) のいずれか 1 つに記載の L-アスパラギン酸の製造方法。

上記、アスパルターゼとしてはアスパルターゼ遺伝子を含む形質転換体、又は

その処理物を固定化したものを用いることができる。

【0013】

また、アスパルターゼとして、250 U/ml 以上の活性を有する固定化アスパルターゼを含む反応器にフマル酸換算で8~25%のフマル酸、及びL-アスパラギン酸を含有する、フマル酸、L-アスパラギン酸アンモニア混合溶液を通液する上記方法で通液速度はLHSV=2~25とすることが好ましい。

なお、1 U = 1 μ mol L-アスパラギン酸生成/min/ml 固定化酵素を、
LHSV (空塔速度) = 通液容量 (ml) / 触媒充填容量 (ml) 1時間あたり、をそれぞれ意味する。

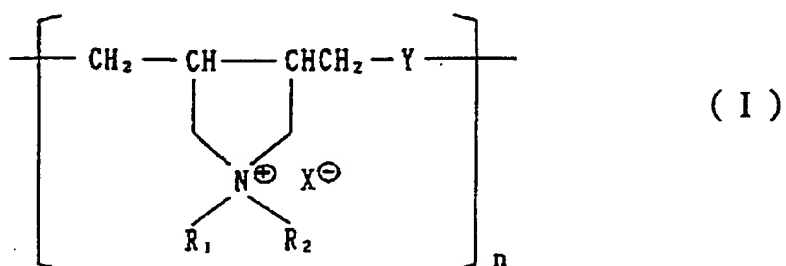
【0014】

また、固定化アスパルターゼとしては固定化の担体としてイオン交換樹脂を用い、吸着あるいはポリマーでの被覆によって菌体あるいは菌体処理物を前記担体に固定化したものを用いることができる。

また、固定化アスパルターゼとしては固定化の担体として球状のスチレンジビニルベンゼン共重合体イオン交換樹脂を用い、次の一般式 (I)

【0015】

【化1】

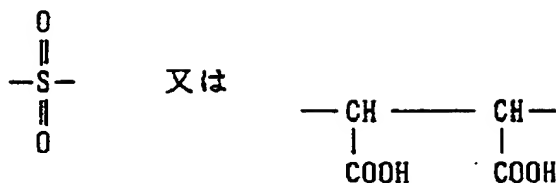


【0016】

(式中、Yは直接結合であるか、又は次式

【0017】

【化2】



【0018】

により表される2価基であり、 R_1 及び R_2 は相互に独立に水素原子又は有機残基であり、

【0019】

【化3】



【0020】

は陰イオンを表し、そしてnは100~5000の数である)

により表されるポリマーと菌体あるいは菌体処理物を混合し球状スチレンジビニルベンゼン共重合体イオン交換樹脂表面に被覆したものを前記担体に固定化したものを用いることができる。

【0021】

前記式(I)において、 R_1 又は R_2 で表される有機残基としては、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基などの炭素数10個以下のアルキル基が挙げられ、特にメチル基が好ましい。さらに、ハロゲンやヒドロキシル基等の置換基を有する有機残基を使用することができ、例えば、4-クロロ-2-ジメチルペンチル基、3-エチル-2,5-ジクロロヘプチル基、2-ヒドロキシ-3,5-ジメチルノニル基など、好ましくは3-クロロ-2-ヒドロキシブチル基を用いることがで

きる。また、陰イオンとしては、例えば、 F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 等のハロゲンイオンが挙げられる。

【0022】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する

本発明に用いるアスパルターゼ活性を有する酵素含有物は、例えば、高アスパルターゼ活性を有することが知られている大腸菌やブレヴィバクテリウム属、シュードモナス属の微生物などの菌体、あるいはこれらの菌体を超音波、摩砕、凍結融解、酵素処理、界面活性剤処理などを施して破砕した菌体破砕物、さらに硫酸アンモニウム塩析、アセトン沈殿など、常法により得られる部分精製したもの、あるいはクロマトカラム等、常法で得られる精製したものなどであり、そのいずれでも使用できる。フマル酸の中和に一部水酸化ナトリウムを用いると、相対的にアンモニアの量が少なくなり、これによってフマル酸からL-アスパラギン酸への反応速度が低下する。そのため、アスパルターゼ活性を有する菌体としては、特にアスパルターゼ遺伝子を組み込んだプラスミドによって形質転換され、アスパルターゼを著量生成するようになった大腸菌を用いるのが好ましい。本発明に使用できるアスパルターゼ遺伝子は、大腸菌 (*Escherichia coli*) やシュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*)、エンテロバクター (*Enterobacter*) 属、シトロバクター (*Citrobacter*) 属に属する微生物などで大腸菌 (*Escherichia coli*) と自然界で遺伝子の交雑が認められている微生物であってアスパルターゼ活性を有している微生物由来のものであれば好適に使用できる。そして、この遺伝子は、例えば、大腸菌 *Escherichia coli* K-12 (IFO3301) 染色体 DNA、*Pseudomonas fluorescens* (IFO3081) 染色体 DNA から、公知のアスパルターゼ遺伝子配列をもとにして作成したプライマーを用いて、PCR法によって増幅することにより取得することができる。

【0023】

アスパルターゼ遺伝子を組み込むプラスミドは大腸菌 *Escherichia coli* に属する微生物菌体内で複製されるプラスミドであれば特に限定されないが、pUC18、pKK223-3などを用いることができる。またアスパルターゼ遺伝子を組み込んだプ

ラスミドを導入する宿主微生物としては大腸菌*Escherichia coli* K-12株が好適に用いられる。これらのアスパルターゼ活性含有微生物菌体、あるいはその処理物、又は酵素を担体に固定化して用いることもできる。

【0024】

固定化の担体としては、セルロース、アルギン酸、カラギーナン、マンナンゲルなどの天然系高分子、あるいは、イオン交換樹脂やポリビニルアルコール、ポリアクリルアミドなどの適当な合成高分子を常法により用いることができる。これらの中でも、特に、球状のスチレンジビニルベンゼン共重合体イオン交換樹脂担体に、前記一般式(I)により表されるポリマーと菌体あるいはその処理物とを混合したものを被覆することによって固定化したものが好ましい。

この方法で固定化して作成した固定化アスパルターゼは圧力損失が少なく、拡散層も薄いので拡散抵抗が小さく、高SVでの反応に使用することができる。

【0025】

本発明に用いられる基質はフマル酸アンモニウム塩溶液、すなわちフマル酸アンモニア中和塩水溶液である。中和に用いるアンモニアの使用量は特に限定されないが、基質液中のフマル酸に対して、好ましくは1.8~2.8倍モル、より好ましくは2.0~2.4倍モルの範囲である。基質液のpHは特に限定されないが、25℃の温度条件下で、好ましくは6~11、より好ましくは7~10、最も好ましくは7.5~9.5の範囲にする。

反応の際のフマル酸濃度は通常5~25重量%の範囲が好ましいが、生産性と得られるL-アスパラギン酸の純度、フマル酸塩の溶解度を考慮すると特に12~25重量%の範囲で反応させるのが効果的である。

また基質媒体にはさらに、塩化マンガン、硫酸マンガンなどのマンガン塩、又は塩化マグネシウム、硫酸マグネシウムなどのマグネシウム塩、コバルト塩などの2価金属塩を添加することが望ましく、好ましくは0.1~50mM、より好ましくは1~10mMの濃度で添加することが望ましい。

【0026】

本発明における反応槽の態様は特に限定されないが、たとえばバッチ型反応装置、カラム型反応装置など、従来から知られている反応槽で行うことができる。

反応槽は一つであっても、複数であっても差し支えない。工業的な大量生産には、特にカラム型反応装置が好ましく、先のスチレンジビニルベンゼン共重合体イオン交換樹脂担体に、一般式 (I) により表されるポリマーと、アスパルターゼ遺伝子を組み込んだプラスミドによって形質転換され、アスパルターゼを著量生成するようになった大腸菌菌体を混合したものを被覆して作成した固定化アスパルターゼを用いると、通液速度 $LHSV = 2 \sim 25$ の範囲で反応を行うことができる。通常の大腸菌を固定化して用いる場合には活性があまり高くないので、反応時間を長くしたり、通液速度を遅くしたりする必要があるが、上記のアスパルターゼ遺伝子組み換え体固定化アスパルターゼは非常に活性が高いため、上記の通液速度でも十分に転化率をあげることができる。反応の際の温度は、低温では反応速度が低下するため、通常 10°C を下限とし、高温下ではアスパルターゼの失活を招くため 50°C を上限とするのが好ましく、より好ましくは $15 \sim 40^{\circ}\text{C}$ の範囲とする。

【0027】

上記のような条件で、フマル酸アンモニウム塩溶液を、アスパルターゼによる酵素反応に供し、L-アスパラギン酸アンモニウム塩溶液に転化する。反応は、転化率が高ければよいが、平衡に達していなくても、転化率 90% 程度であれば、後の L-アスパラギン酸の結晶析出には支障はない。

次に、このようにして得られた反応液を加温する。加温する温度は 50°C 以上である。加熱温度の上限は特にないが、反応液の変質などの問題がない 130°C 程度を上限とする。この時の温度があまり低すぎるとフマル酸を添加したときに均質に溶解せず、フマル酸結晶を包含した L-アスパラギン酸が析出し、純度が低下するので好ましくない。またこの範囲より高すぎると、反応液が変質したり、また高耐圧の装置を使用する必要があるため好ましくない。次いで、加温された反応液にフマル酸を添加する。添加するフマル酸の量は、反応液中に存在するフマル酸と L-アスパラギン酸の合計に対して 0.4 ~ 0.8 倍モルの範囲であり、好ましくは 0.45 ~ 0.6 倍モルの範囲である。この範囲より少ないと、結晶として分離できる L-アスパラギン酸量が少なくなるため好ましくない。またこの範囲より多いと、フマル酸を添加した後、均質な状態に溶解せず、得

られる L-アスパラギン酸にフマル酸及びその塩が混入してくることにより純度が低下するため好ましくない。

【0028】

フマル酸の添加の際の形態としては、フマル酸乾燥結晶、水分を含んだフマル酸結晶、フマル酸の水懸濁液などを用いることができる。特に、水分を含んだフマル酸結晶は粉塵などを含まず、また加温した反応液へのなじみも良いため、これを用いると溶解に要する時間が短くなるなどの利点がある。水分を含んだフマル酸結晶の含水率は 0.5～40 重量%の範囲が好ましく、特に 3～10%の範囲が好ましい。この範囲より少ないと、フマル酸粉塵が発生する恐れがあるため好ましくない。またこの範囲より多いと、粉体として取り扱うことが難しくなるため好ましくない。また、フマル酸の水懸濁液を使用すると、ポンプを用いてスラリーを反応液に添加することができ、工業的に実施しやすくなるため好ましい。フマル酸の水懸濁液中の水分はフマル酸に対して 50～200 重量%の範囲が好ましく、より好ましくは 60～150 重量%の範囲である。この範囲より少ないと、流動性が少なくなり、スラリーとしてポンプで添加するのが難しいため好ましくない。また、この範囲より多いと、反応液をリサイクル使用する際に濃縮する水の量が多くなるため好ましくない。また、この水分を含んだフマル酸結晶又はフマル酸の水懸濁液を、上述のように加温した反応液と同じ温度に加温しておくと、反応液への溶解が早くなるため好ましい。

【0029】

フマル酸を添加した反応液は 50℃以上 130℃以下でせん断力をかけて溶解させる。せん断力は、具体的には激しく攪拌、混合することによりかけることができる。これにより、反応液はフマル酸の結晶も L-アスパラギン酸の結晶も存在しない均質溶液となる。このときのせん断力をかける方法はバッチ式の攪拌槽、連続式の混合管などを用いることができる。連続式の混合管としては、スタティックミキサーなどのラインミキサー等が好ましい。混合溶解に要する時間はラインミキサーでは 0.1～数秒程度であり、攪拌槽では 1～10 分程度である。

【0030】

フマル酸を溶解させた反応液は、0.1 秒～1 時間、その温度を保持すること

が好ましい。場合によっては、この操作によってL-アスパラギン酸の結晶の析出が始まる。このとき、溶液中のフマル酸とL-アスパラギン酸の合計に対するアンモニアのモル比は、(フマル酸+L-アスパラギン酸) : アンモニア = 1.1 : 1 ~ 1.6 : 1 であり、アンモニアの量がL-アスパラギン酸とフマル酸を中和するに必要な量よりも少ない。このような条件下では、フマル酸とL-アスパラギン酸の結晶が完全に中和されていないため、通常の条件では完全に溶解せず、フマル酸が溶解するに従って、アンモニウムイオンと対塩を形成することによって溶解しているL-アスパラギン酸がアンモニウムイオンをフマル酸に奪われて、L-アスパラギン酸結晶として析出してくる。しかし、反応液を加温しておき、フマル酸の溶解を速やかに行うと、フマル酸の結晶もL-アスパラギン酸の結晶も存在しない均質溶液とすることができ、その後析出させるL-アスパラギン酸の純度を高くすることができる。

【0031】

L-アスパラギン酸の結晶析出は、この溶液を攪拌しながら放置又は冷却することによって行うことができる。この操作は、当業者に公知の方法により行うことができるが、特に例示すれば次のように行う。まず、23% L-アスパラギン酸アンモニウム塩溶液(25℃でpH 8.5) 1Lを95℃に加熱し、この反応液にフマル酸を100g添加し激しく攪拌すると、一旦均質溶液となる。この溶液を攪拌しながら放置すると、約3分で少量のL-アスパラギン酸の微結晶が析出しはじめ、溶液が半透明となる。さらに攪拌を30分継続するとL-アスパラギン酸の結晶析出が進み、全体が白濁した状態となる。この溶液をさらに冷却すると、大量のL-アスパラギン酸の結晶が析出する。

【0032】

また、別の例では、23% L-アスパラギン酸アンモニウム塩溶液(25℃でpH 9.5) 1Lを95℃に加熱し、この反応液にフマル酸を100g添加し激しく攪拌すると、一旦均質溶液となる。この溶液を攪拌しながら30分放置しても結晶は析出しない。この溶液を冷却すると83℃付近で半透明となり、L-アスパラギン酸の微結晶が析出し始める。この溶液をさらに冷却するとL-アスパラギン酸結晶が析出し始める。

【0033】

このときの冷却の速度は特に限定されないが、好ましくは1分間に0.1～5℃、より好ましくは0.2～3℃の範囲である。この範囲より速いと、析出するL-アスパラギン酸の純度が低下するだけでなく、結晶のサイズが小さくなり、結晶の取り扱いが困難となるため好ましくない。また、この範囲より遅いと、冷却に長時間を要することとなり、生産性が悪くなるため好ましくない。

【0034】

この冷却の方法としては、通常、攪拌槽を使用する方法を用いる。このような方法としては、ジャケットにおいて冷却する方法、減圧下で水を蒸発させ、凝縮器によって蒸発させた水を凝縮させて攪拌槽に戻すことによって蒸発潜熱を奪うことにより冷却する方法などを採用することができる。特に、蒸発潜熱による冷却方法では、冷却面にL-アスパラギン酸の結晶が付着することがなく、冷却効率が低下しないので、効率よく冷却を行うことができるため、工業的に有利である。

【0035】

この蒸発潜熱による冷却方法での冷却の際の減圧の速度は、フマル酸を添加した液が沸騰を始める蒸気圧から10～200Torr、好ましくは50～100Torr高い圧力から、1分間に1～20Torr、好ましくは2～10Torrの速度で減圧度を高めるのが好ましい。この範囲より遅いと、冷却に長時間を要するため好ましくなく、また、この範囲より速すぎると、フマル酸を添加した液が突沸したり、析出する結晶のサイズが小さくなりすぎたりするため好ましくない。結晶が小さくなりすぎた場合には、結晶サイズが数 μ mになることもあり、結晶分離の際やその後の取り扱いが困難となる。また、冷却ジャケット付きのスタティックミキサーなどのラインミキサーを用いると、効率よく冷却を行うことができるので好ましい（図1参照）。

【0036】

フマル酸を添加した液は、好ましくは25～50℃、より好ましくは30～45℃まで冷却する。冷却を終了した液は、その温度を保ったまま、1分～1時間保持してL-アスパラギン酸結晶の析出を完了させることが好ましい。このよう

にして析出させた L-アスパラギン酸の結晶の形状は、主に平均 30~1000 μm の長さの針状結晶であり、濾過の際の液の液切れが良く、簡易な洗浄操作によって純度を高くすることができる。

【0037】

析出した L-アスパラギン酸の分離方法については、吸引濾過や遠心濾過など、通常の方法で行うことができるが、特に含水率を低くすることができる遠心濾過などの方法が好ましい。遠心濾過では遠心器の能力によって異なるが、分離した L-アスパラギン酸結晶含水率を 5~30% 程度に下げることができ、これによって高純度の L-アスパラギン酸結晶を得ることができる。

【0038】

分離された L-アスパラギン酸の結晶は、必要に応じて水で洗浄される。洗浄を行わない場合、L-アスパラギン酸の純度は 98~99 重量% 程度になるが、洗浄を行うことにより、L-アスパラギン酸の結晶に少量混入してくるフマル酸塩の量を少なくことができ、得られる L-アスパラギン酸の純度を安定して 99 重量% 以上にすることができるので好ましい。しかしながら、結晶を分離した母液の再使用を考えた場合、あまり大量の水で洗浄することは好ましいことではない。使用する洗浄水の量は、L-アスパラギン酸結晶の量に対して 2~200 重量% の範囲、好ましくは 4~100 重量%、より好ましくは 8~50 重量% の範囲で用いるのがよい。

【0039】

このようにして、簡単な方法により、少量の、例えば 0.05~2 重量%、好ましくは 0.1~1 重量% のフマル酸塩を含有する L-アスパラギン酸を得ることができる。このフマル酸塩を含有する結晶は、乾燥後の結晶が飛散しにくいいため取り扱いが容易であり、工業用 L-アスパラギン酸として極めて有用である。また、この L-アスパラギン酸はさらに精製を繰り返すことによって、食品添加物、医薬品用などに用いることも可能である。

【0040】

L-アスパラギン酸を分離した母液は、上記洗液と混合し、フマル酸及びアンモニアを添加して L-アスパラギン酸製造用の基質液として再使用することがで

きる。この場合には、必要に応じて、母液及び／又は洗液を濃縮するなどの適切な調整をする。例えば、洗液や添加するアンモニア水からくる水の量だけ容量が増えるので、母液及び／又は洗液を濃縮することによってアンモニア水添加後に初期の容量になるようにすることができる。

【0041】

添加するフマル酸の量は、結晶として分離されたＬ－アスパラギン酸のモル数からＬ－アスパラギン酸の晶析のために添加したフマル酸のモル数を差し引いた量であればよい。また、アンモニアの量は、結晶として分離されたＬ－アスパラギン酸のモル数と同モルの量であればよい。こうすることによって、溶液中に存在するフマル酸とＬ－アスパラギン酸の合計モル数に対して、アンモニアとＬ－アスパラギン酸の合計モル数の比を 1 : 1.8 ~ 2.5 の範囲にすることができる。このとき、溶液の pH は 25℃ で 7.5 ~ 9.5 の範囲である。

【0042】

具体的には、Ｌ－アスパラギン酸を分離した母液と洗浄液に上記フマル酸を添加し、加熱減圧することによって過剰の水分を留去して濃縮し、ここに上記アンモニアを添加することによってＬ－アスパラギン酸製造のための原料液とすることができる。

このようにして調節した基質液を用いて、アスパルターゼ活性を有する酵素含有物による反応、加熱、フマル酸の添加、冷却によるＬ－アスパラギン酸結晶の析出、Ｌ－アスパラギン酸結晶の分離及び母液の再調製を繰り返すことにより、母液が基質液として循環使用される。本発明によれば、母液の循環は 10 回以上可能である。

【0043】

また循環使用を繰り返すことによって反応液が淡黄色に着色するが、必要に応じて酵素含有物による反応後、その反応液の一部をパージし、着色物質の蓄積を防ぐこともできる。パージする反応液の量は、全反応液に対して 3 ~ 20 %、好ましくは 5 ~ 10 % の範囲である。パージした反応液中に含まれるＬ－アスパラギン酸は硫酸などの鉱酸によって、通常の方法で結晶析出及び分離することによって回収することができる。また、着色物質の蓄積を防ぐためには、反応液を活

性炭処理するなどの通常の方法を用いることもできる。

【0044】

【実施例】

次に本発明を実施例をあげて具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はかかる実施例に限定されるものではない。

〔調製例1〕

遺伝子工学的手法による大腸菌由来のアスパルターゼの調製方法を説明する。

【0045】

(i) *Escherichia coli* アスパルターゼ組み換え体の作成

財団法人醗酵研究所から購入した大腸菌 (*Escherichia coli*) IFO3301株を表1に示すLB培地に接種して、37℃で8時間培養した。この培養液1mlから菌体を回収し、蒸留水1mlに懸濁した。この菌体懸濁液1μlをアスパルターゼ遺伝子を増幅するための鋳型DNAとして用いた。

【0046】

【表1】

LB培地組成	
ポリペプトン	10 g
酵母エキス	5 g
NaCl	10 g
蒸留水	1 L

121℃、15分オートクレーブ滅菌

【0047】

(ii) PCRでのアスパルターゼ遺伝子の増幅と挿入断片の作成

公知の大腸菌 (*Escherichia coli*) K-12株のアスパルターゼ遺伝子配列 (配列番号1) (Biochem.J.237(2),547-557)をもとに大腸菌 (*Escherichia coli*) のアスパルターゼ遺伝子を増幅するために以下の2つのプライマーを作成した。

【0048】

プライマーF: GGATAATCGTCGGTCGAAAA (配列番号2)

プライマーR: CGTCATCTGACGTGCCTTT (配列番号3)

KODDNAポリメラーゼ (TOYOBO) を用いて、下記表2に示す組成の反

応液を調製し、PCRでのアスパルターゼ遺伝子の増幅を行った。

【0049】

【表2】

10×Buffer	5 μ l
dNTPs Mix	5 μ l
MgCl ₂	2 μ l
鋳型DNA	1 μ l
KODDNA ポリメラーゼ	1 μ l
プライマーF (25pmol)	1 μ l
プライマーR (25pmol)	1 μ l
滅菌水	34 μ l
合 計	50 μ l

【0050】

PCR条件

①98℃ 5分

②98℃ 30秒

③53℃ 30秒

④68℃ 1分 ②から④のサイクルを30回繰り返す

PCRの反応終了後、増幅されたDNA断片を1%アガロースゲルで電気泳動、エチジウムブロマイド染色したところ、予想された約1600bpの断片が増幅されていた。

【0051】

この断片をアガロースゲルから切り出して、Prep-A-Gene (Bio Rad)でDNAを回収した。

(iii) ベクターへの挿入断片の結合

pCR-Script Amp SK (+) クローニングベクターに制限酵素SrfとDNAリガーゼの存在下、先に回収したDNA断片を結合させた。

この挿入DNA断片を入れた形質転換体の一つをPUaspE1株と命名した。このP

UaspE1株をアンピシリン100ppmを添加したLB培地3mlに接種し、37℃で一夜振とう培養し、その培養液1.5mlから菌体を回収した。この菌体から、アルカリSDS法によってプラスミドを回収した。このプラスミドをpUaspE1と命名した。

【0052】

このプラスミドの挿入断片の配列を解析したところベクターのプロモーターに対して逆向きにアスパルターゼ遺伝子が挿入されていることがわかった。

プロモーターに対して、順向きにつなぎ直すために、プラスミドpUaspE1から制限酵素SacIとBamHIで挿入断片を切り出し、pUC19を導入することにした。プラスミドpUaspE1を制限酵素BamHIで切断した後エタノール沈殿によってDNAを回収し、次いで制限酵素SacIで切断した。切断したDNA断片を1%アガロースゲルで電気泳動することによって分離し、ゲルから切り出して prep-A-Gene(bio rad)でDNAを回収した。

【0053】

(iv) ベクターの作成

プラスミドpUC19 (ニッポンジーン製) 1 μ g を制限酵素BamHIで切断後、エタノール沈殿によってDNAを回収し、次いで制限酵素SacIで切断した。切断したDNA断片を1%アガロースゲルで電気泳動することによって分離し、ゲルから切り出して prep-A-Gene(bio rad)でDNAを回収してベクターとした。

ベクターへの挿入断片の結合

制限酵素で切断したベクターと挿入断片をライゲーションハイ (TOYOBO) を用いて16℃、30分結合させた。

【0054】

(v) 大腸菌の形質転換

ベクターと挿入断片を結合させた反応液2 μ lを大腸菌コンピテントセル(XL2-Blue MRF' Ultracompetent cells STRATAGENE社製) 200 μ lに入れ、大腸菌を形質転換した。形質転換した大腸菌をアンピシリン100ppmを含有するLB寒天培地に広げて37℃、一夜培養した。

コントロールとして、挿入断片を挿入していないプラスミドpUC18で形質転換

し、同様にアンピシリン100ppmを含有するLB寒天培地に広げて37℃で一夜培養した。

【0055】

出現したコロニーを20個釣り上げ、アンピシリン100ppmを含有するLB培地に接種して、37℃で振とう培養した。8時間後、IPTG（イソプロピルチオ-β-D-ガラクトシド）を1mMの濃度に添加して、さらに一夜30℃で振とう培養し、培養液1mlから菌体を回収した。

同様に、挿入断片をもたないコントロールの形質転換体1株を培養し、菌体を回収した。この回収した菌体に表3に示すフマル酸アンモニウム基質液1mlを添加して、菌体を懸濁させ、30℃で1時間反応させた。

【0056】

【表3】

20%フマル酸アンモニウム基質液組成

フマル酸	200	g
25%アンモニア水	200	g
硫酸マグネシウム7水塩	2.5	g
イオン交換水	500	g
25%アンモニア水でpH8.3とした後に、イオン交換水を追加して1Lとした。		

【0057】

反応液を分析したところ、挿入断片を入れた大腸菌形質転換体は、L-アスパラギン酸への転化率99.5%であった。一方挿入断片を入れていないコントロールの形質転換体は転化率5%であった。

この挿入断片を入れた形質転換体の一つをPUaspE2と命名した。

PUaspE2をアンピシリン100ppmを添加したLB培地3mlに接種し37℃で8時間培養した。この培養液1.5mlからアルカリSDS法によってプラスミドを回収した。このプラスミドをpUaspE2と命名した。プラスミドpUaspE2を制限酵素SmaI、ついで制限酵素HindIIIで切断後、1%アガロースゲル電気泳動によってDNA断片の大きさを計算したところ、約2960bpと1600bpの2本の断片が存在していた。

【0058】

PUaspE2株をアンピシリン100ppmを添加したLB培地3mlに接種し、37℃で振とう培養し、8時間後、IPTG（イソプロピルチオ-β-D-ガラクトシド）を1mMの濃度に添加して、さらに一夜30℃で振とう培養した。この培養液1mlから菌体を回収するとともに菌体濃度OD660nmを測定したところ8.0であった。この菌体を20%フマル酸アンモニウム基質液10mlに懸濁し、30℃で1時間反応させた後、反応液をHPLC分析した。生成したL-アスパラギン酸と菌体濃度から、アスパルターゼ活性を計算したところ、2,000,000μM-L-アスパラギン酸生成/hr/OD660nm菌体濃度であった。

【0059】

同様に、挿入断片をもたないコントロールの形質転換体1株を培養し、菌体を回収するとともに菌体濃度OD660nmを測定したところ8.5であった。

この菌体を20%フマル酸アンモニウム基質液10mlに懸濁し、30℃で1時間反応させた後、反応液をHPLC分析した。生成したL-アスパラギン酸と菌体濃度から、アスパルターゼ活性を計算したところ、10,000μM-L-アスパラギン酸生成/hr/OD660nm菌体濃度であった。このように取得したPUaspE2株は挿入アスパルターゼ遺伝子を持たない株の200倍のアスパルターゼ活性を有していた。

【0060】

(vi) 組み換え体の培養

大腸菌 (*Escherichia coli*) のアスパルターゼの組換え大腸菌PUaspE2株を表1に示す培地にアンピシリン100ppmを含む培地3mlを入れた試験管10本に接種して37℃で8時間培養後、同組成の培地にIPTGを1mMを添加した培地100mlを入れた坂口フラスコ10本にそれぞれ1本ずつ接種し、30℃で一夜振盪培養した。この培養液から、菌体を遠心分離によって回収した。この菌体のアスパルターゼ活性を測定したところ1.05moles L-アスパラギン酸生成/hr/g菌体であった。

【0061】

アスパルターゼ遺伝子組み換え体を用いた固定化アスパルターゼの作成

PAS-880（日東紡績製）をアルカリでpH7.0付近にしたもの70g及び

脱イオン水230 gをよく混合し、先に回収した菌体を均一に分散させた。6 Lのナス型フラスコにイオン交換樹脂（アンバーライトIRA-94SC1型オルガノ社製、平均粒径0.5mm）300 mlと0.5インチのテフロン球 200個を入れ、ここに先に得た菌体分散液の1/6を入れ、30℃で回転させながらエバポレーターで1時間乾燥し、菌体をイオン交換樹脂に被覆させた。この操作を6回行った後、テフロン球を除去してビーズ状の固定化アスパルターゼを得た。この固定化アスパルターゼの活性は3500 U/mlであった。（1 U = 1 μ moles L⁻¹ アスパラギン酸生成/min/ml 固定化酵素）

【0062】

大腸菌 IFO3301 株の培養

アスパルターゼ遺伝子を導入していない、大腸菌株 IFO3301 をアンピシリンとIPTGを添加しない以外は先と同様に培養し、菌体を回収した。

【0063】

非組み換え体固定化アスパルターゼの作成

大腸菌 IFO3301 株菌体を用いた以外は、先と同様にして、ビーズ状の固定化アスパルターゼを得た。この固定化アスパルターゼの活性は 180 U/mlであった。（1 U = 1 μ moles L⁻¹ アスパラギン酸生成/min/ml 固定化酵素）

【0064】

〔実施例1〕

調製例1において調製したアスパルターゼ遺伝子組み換え体固定化アスパルターゼを20%フマル酸アンモニウム溶液（pH 8.3）に一晩浸漬したのち、その500 mlをカラムに充填し、カラムの外部を発泡ポリスチレンの保温材で保温することによって反応器を断熱した。このカラムに、20℃の恒温水槽で保温した20℃の表4に示す基質液を断熱材を巻いたテフロンチューブを通して、毎時5 Lの速度（LHSV = 10.0）で流通させ連続反応を行った。

【0065】

【表4】

フマル酸	2.00 kg
25%アンモニア水	2.34 kg (フマル酸に対して2.0倍モル)
硫酸マグネシウム	25 g

脱イオン水に溶解し、25%アンモニア水を用いて25℃でpH8.5にした後に、水を加えて10Lとする。

【0066】

反応開始後1時間目に反応液の分析を行ったところ、反応生成物として、消費されたフマル酸とほぼ等モルのL-アスパラギン酸が生成し、その反応変換率は99.2%であった。この反応液10L(重量11.1kg)を、冷却管を取り付けて減圧、還流できるようにした20Lのフラスコに入れ、95℃に加熱した。ここにフマル酸1.0kgを添加して攪拌すると、約2分でフマル酸結晶が完全に溶解した。攪拌を継続すると約1分でL-アスパラギン酸の結晶が析出し始めた。溶液の温度を95℃で30分保持した後、フラスコ内を400Torrまで減圧し、その後、1分間に3Torrの割合で減圧すると、370Torr付近でL-アスパラギン酸が析出した液が沸騰を始めた、冷却管で蒸発した水を凝縮させてフラスコに戻しながらさらに1分間に3Torrの割合で減圧していった。約2時間後、50TorrでL-アスパラギン酸が析出した液の温度が40℃になったので、フラスコ内を常圧にもどした。この状態で30分攪拌を継続しL-アスパラギン酸の結晶を完了させた。析出したL-アスパラギン酸の結晶を、遠心濾過器によって分離し、水1Lで洗浄した。得られたL-アスパラギン酸の結晶は1.86kg(含水率7.0%)であり、乾燥後の重量は1.73kg、純度は99.7%であり、その形状は主に平均500 μ mの長さの針状結晶であった。このL-アスパラギン酸結晶を10Lの水に懸濁して攪拌し、ついで遠心濾過してL-アスパラギン酸の結晶を分離した。得られたL-アスパラギン酸の結晶は1.84kg(含水率7.0%)であり、乾燥後の重量は1.71kg、純度は99.9%であった。

【0067】

L-アスパラギン酸を分離した母液とL-アスパラギン酸を洗浄した洗液をあわせ、ここにフマル酸0.51kgを添加してロータリーエバポレータで水2kgを留去して濃縮した。この液に25%アンモニア水885gを追加し、水を加えて全量を11.1kgとした。この溶液のpHは25℃で8.5であった。

表4に示した基質液10Lを用いて同様の操作を行い、L-アスパラギン酸結晶1.89kg（含水率7.2%）を得た。このL-アスパラギン酸結晶の純度は99.6%であった。同様に母液、洗液にフマル酸を0.53kg添加し、濃縮した後に25%アンモニア水を追加し、25℃でのpHを8.5に調節し、水を加えて11.1kgとした。この液を先の再調製液とあわせて20℃の恒温水槽で保温し、前記のアスパルターゼ遺伝子組み換え体固定化アスパルターゼを充填したカラムに、断熱材を巻いたテフロンチューブを通して、毎時5Lの速度（ $LHSV=10.0$ ）で流通させ連続反応を行った。反応開始後1時間目に反応液の分析を行ったところ、反応生成物として、消費されたフマル酸とほぼ等モルのL-アスパラギン酸が生成し、その反応変換率は99.2%であった。この反応液10Lを用いて先と同様の操作を行い、L-アスパラギン酸結晶1.86kg（含水率7.1%）を得た。このL-アスパラギン酸結晶の純度は99.7%であった。さらにこの操作を繰り返し、20Lを1単位とした反応液を5回再調製して使用した。その結果を表5に示す。

【0068】

【表5】

晶析回数	1	2	3	4	5
反応転化率 (%)	99.2	99.2	99.3	99.2	99.2
湿 L-アスパラギン酸結晶 (kg)	3.7	3.78	3.72	3.76	3.74
含水率 (%)	7.0	7.1	7.4	7.2	7.1
乾燥重量 (kg)	3.49	3.51	3.4	3.49	3.47
純度 (%)	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7
結晶形状	針状	針状	針状	針状	針状
注 20L を 1 単位として、合計した数値で示した。					

【0069】

【実施例2】

L-アスパラギン酸の晶析のために添加するフマル酸として5%の水分を含んだフマル酸湿結晶を用いた以外は実施例1と同様にして、加熱、フマル酸の添加を行った。5%含水フマル酸1.06kgを添加して攪拌すると、約30秒でフマル酸結晶が完全に溶解した。攪拌を継続すると約3分でL-アスパラギン酸の結晶が析出し始めた。実施例1と同様にして冷却後、析出したL-アスパラギン酸の結晶を遠心濾過器によって分離し、水1Lで洗浄した。得られたL-アスパラギン酸の結晶は1.85kg（含水率7.0%）であり、乾燥後の重量は1.72kg、純度は99.7%であり、その形状は主に平均500 μ mの長さの針状結晶であった。

【0070】

【実施例3】

調製例1において調製したアスパルターゼ遺伝子組み換え体固定化アスパルターゼを20%フマル酸アンモニウム溶液（pH8.3）に一晩浸漬したのち、その50mlをカラムに充填し、カラムの外部を発泡ポリスチレンの保温材で保温することによって反応器を断熱した。このカラムに、20℃の恒温水槽で保温した20℃の表6に示す基質液を、断熱材を巻いたテフロンチューブを通して、毎

時 5 L の速度 (LHSV = 10.0) で流通させ連続反応を行った。

【0071】

【表 6】

フマル酸	2.00 kg
25%アンモニア水	2.34 kg (フマル酸に対して 2.0 倍モル)
硫酸マグネシウム	25 g
脱イオン水に溶解し、25%アンモニア水を用いて 25℃で pH 9.5 にした後、水を加えて 10 L とする。	

【0072】

反応開始後 1 時間目に反応液の分析を行ったところ、反応生成物として、消費されたフマル酸とほぼ等モルの L-アスパラギン酸が生成し、その反応変換率は 99.7% であった。この反応液 10 L (重量 11.1 kg) を、冷却管を取り付けて減圧、還流できるようにした 20 L のフラスコに入れ、95℃に加熱した。ここにフマル酸 1.00 kg を添加して攪拌すると、フマル酸結晶が完全に溶解した。攪拌を 30 分継続しても L-アスパラギン酸の結晶は析出せず均質な溶液であった。溶液の温度を 95℃で 30 分保持した後、フラスコ内を 400 Torr まで減圧し、その後、1 分間に 3 Torr の割合で減圧すると、370 Torr 付近で L-アスパラギン酸が析出した液が沸騰を始めた、冷却管で蒸発した水を凝縮させてフラスコに戻しながらさらに 1 分間に 3 Torr の割合で減圧していった。途中、液温 83℃付近で L-アスパラギン酸の結晶が析出し始めた。約 2 時間後、50 Torr で L-アスパラギン酸が析出した液の温度が 40℃になったので、フラスコ内を常圧にもどした。この状態で 30 分攪拌を継続し L-アスパラギン酸の結晶を完了させた。析出した L-アスパラギン酸の結晶を遠心濾過器によって分離し、水 1 L で洗浄した。得られた L-アスパラギン酸の結晶は 1.68 kg (含水率 7.0%) であり、乾燥後の重量は 1.56 kg、純度は 99.7% であり、結晶形状は主に平均 700 μm の長さの針状結晶であった。

【0073】

L-アスパラギン酸を分離した母液と L-アスパラギン酸を洗浄した洗液をあ

わせ、ここにフマル酸 160 g を添加してロータリーエバポレータで水 2 kg を留去して濃縮した。この液に 25 % アンモニア水 680 g を追加し、水を加えて全量を 11.1 kg とした。この溶液の pH は 25℃ で 9.5 であった。

表 6 に示した基質液 10 L を用いて同様の操作を行い、L-アスパラギン酸結晶 1.45 kg (含水率 7.2 %) を得た。この L-アスパラギン酸結晶の純度は 99.7 % であった。同様に母液、洗液にフマル酸を 170 g 添加し、濃縮した後 25 % アンモニア水を追加して、25℃ での pH を 9.5 に調節した後、水を加えて 11.1 kg とした。この液を先の再調製液とあわせて 20℃ の恒温水槽で保温し、前記のアスパルターゼ遺伝子組み換え体固定化アスパルターゼ充填したカラムに、断熱材を巻いたテフロンチューブを通して、毎時 5 L の速度 (LHSV = 10.0) で流通させ連続反応を行った。反応開始後 1 時間目に反応液の分析を行ったところ、反応生成物として、消費されたフマル酸とほぼ等モルの L-アスパラギン酸が生成し、その反応変換率は 99.7 % であった。この反応液 1 L を用いて先と同様の操作を行い、L-アスパラギン酸結晶 1.69 kg (含水率 7.1 %) を得た。この L-アスパラギン酸結晶の純度は 99.7 % であった。さらにこの操作を繰り返し、20 L を 1 単位とした反応液を 5 回再調製して使用した。その結果を表 7 に示す。

【0074】

【表 7】

晶析回数	1	2	3	4	5
反応転化率 (%)	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7
湿 L-アスパラギン酸結晶 (kg)	3.37	3.38	3.39	3.36	3.37
含水率 (%)	7.1	7.2	7.0	7.1	7.0
乾燥重量 (kg)	3.13	3.14	3.15	3.12	3.13
純度 (%)	99.7	99.7	99.7	99.6	99.7
結晶形状	針状	針状	針状	針状	針状
注 20 L を 1 単位として、合計した数値で示した。					

【0075】

〔実施例4〕

調製例1において調製したアスパルターゼ遺伝子組み換え体固定化アスパルターゼを20%フマル酸アンモニウム溶液(pH 8.3)に一晩浸漬したのち、その500mlをカラムに充填し、カラムの外部を発泡ポリスチレンの保温材で保温することによって反応器を断熱した。このカラムに、20℃の恒温水槽で保温した20℃の表4に示す基質液を、断熱材を巻いたテフロンチューブを通して、毎時5Lの速度(LHSV=10.0)で流通させ連続反応を行った。

【0076】

反応開始後1時間目に反応液の分析を行ったところ、反応生成物として、消費されたフマル酸とほぼ等モルのL-アスパラギン酸が生成し、その反応変換率は99.2%であった。この反応液10L(重量11.1kg)を、冷却管を取り付けて減圧、還流できるようにした20Lのフラスコに入れ、95℃に加熱した。ここにフマル酸1.00kgを添加して攪拌すると、フマル酸結晶が完全に溶解した。約3分攪拌を継続するとL-アスパラギン酸の結晶が析出し始めた。溶液の温度を95℃で30分保持した後、フラスコ内を400Torrまで減圧し、その後、1分間に3Torrの割合で減圧すると、370Torr付近でL-アスパラギン酸が析出した液が沸騰を始めた。冷却管で蒸発した水を凝縮させてフラスコに戻しながらさらに1分間に3Torrの割合で減圧していった。約2時間後、50TorrでL-アスパラギン酸が析出した液の温度が40℃になったので、フラスコ内を常圧にもどした。この状態で30分攪拌を継続しL-アスパラギン酸の結晶を完了させた。析出したL-アスパラギン酸の結晶を遠心濾過器によって分離し、洗浄水1Lで洗浄した。得られたL-アスパラギン酸の結晶は1.86kg(含水率7.0%)であり、乾燥後の重量は1.73kg、純度は99.7%であり、結晶形状は主に平均500μmの長さの針状結晶であった。上記のL-アスパラギン酸の晶析操作を再度行い、析出したL-アスパラギン酸を遠心濾過によって分離し、洗浄水500mlで洗浄した。得られたL-アスパラギン酸の結晶は1.88kg(含水率7.1%)であり、乾燥後の重量は1.75kg、純度は99.6%であった。同様にして洗浄水の量を250mlにしたところ、得られた

L-アスパラギン酸の結晶は1.86 g (含水率7.0%)であり、乾燥後の重量は1.73 kg、純度は99.5%であった。同様にして洗浄水の量を125 mlにしたところ、得られたL-アスパラギン酸の結晶は1.85 kg (含水率7.2%)であり、乾燥後の重量は1.72 kg、純度は99.4%であった。水での洗浄を行わない以外は同様にして行ったところ、得られたL-アスパラギン酸の結晶は1.98 kg (含水率7.2%)であり、乾燥後の重量は1.75 kg、純度は98.9%であった。

【0077】

〔実施例5〕

調製例1において調製したアスパルターゼ遺伝子組み換え体固定化アスパルターゼを20%フマル酸アンモニウム溶液(pH 8.3)に一晩浸漬したのち、その500 mlをカラムに充填し、カラムの外部を発泡ポリスチレンの保温材で保温することによって反応器を断熱した。このカラムに、20℃の恒温水槽で保温した20℃の表4に示す基質液を、断熱材を巻いたテフロンチューブを通して、毎時5 Lの速度(LHSV=10.0)で流通させ連続反応を行った。

【0078】

反応開始後1時間目に反応液の分析を行ったところ、反応生成物として、消費されたフマル酸とほぼ等モルのL-アスパラギン酸が生成し、その反応変換率は99.2%であった。この反応液10 L (重量11.1 kg)を、冷却管を取り付けて減圧、還流できるようにした20 Lのフラスコに入れ、95℃に加熱した。ここにフマル酸1.00 kgを添加して攪拌すると、フマル酸結晶が完全に溶解した。約3分攪拌を継続するとL-アスパラギン酸の結晶が析出し始めた。溶液の温度を95℃で30分保持した後、フラスコ内を400 Torrまで減圧し、その後、1分間に3 Torrの割合で減圧すると、370 Torr付近でL-アスパラギン酸が析出した液が沸騰を始めた。冷却管で蒸発した水を凝縮させてフラスコに戻しながらさらに1分間に3 Torrの割合で減圧していった。約2時間後、50 TorrでL-アスパラギン酸が析出した液の温度が40℃になったので、フラスコ内を常圧にもどした。この状態で30分攪拌を継続しL-アスパラギン酸の結晶を完了させた。析出したL-アスパラギン酸の結晶を遠心濾過器によって分離し、洗

浄水 1 L で洗浄した。得られた L-アスパラギン酸の結晶は 1.86 kg (含水率 7.0%) であり、乾燥後の重量は 1.73 kg、純度は 99.7% であった。上記の L-アスパラギン酸の晶析操作を再度行い、冷却を 35℃ まで行った。析出した L-アスパラギン酸を遠心濾過によって分離し、洗浄水 1 L で洗浄した。得られた L-アスパラギン酸の結晶は 1.95 kg (含水率 7.0%) であり、乾燥後の重量は 1.81 kg、純度は 99.7% であった。同様の操作を冷却の温度を 30℃ にして行ったところ、遠心濾過で得られた L-アスパラギン酸の結晶は 1.99 kg (含水率 7.1%) であり、乾燥後の重量は 1.85 kg、純度は 99.1% であった。

【0079】

〔実施例 6〕

調製例 1 において調製したアスパルターゼ遺伝子組み換え体固定化アスパルターゼを 20% フマル酸アンモニウム溶液 (pH 8.3) に一晩浸漬したのち、その 500 ml をカラムに充填し、カラムの外部を発泡ポリスチレンの保温材で保温することによって反応器を断熱した。このカラムに、20℃ の恒温水槽で保温した 20℃ の表 4 に示す基質液を、断熱材を巻いたテフロンチューブを通して、毎時 5 L の速度 (LHSV = 10.0) で流通させ連続反応を行った。

【0080】

反応開始後 1 時間目に反応液の分析を行ったところ、反応生成物として、消費されたフマル酸とほぼ等モルの L-アスパラギン酸が生成し、その反応変換率は 99.2% であった。この反応液 5 L をフラスコにとり、95℃ に加熱した。またフマル酸 1000 g と水 600 g を混合してスラリーとし、95℃ に加熱した。この 2 つの液を、シリコンチューブを通してポンプで送り、それぞれの流量を、反応液は 1110 g/分、フマル酸スラリーは 267 g/分に設定した。この 2 つの液を三叉ジョイントで混合してからジャケットに 95℃ の温水を循環させた、ノリタケ製スタティックミキサー (材質ガラス、ジャケット付き、型式 1/4(1)-N40-174-0、内径 5 mm、長さ 325 mm、エレメント数 24) を 2 本連結して導入した (図 1 参照)。この時のスタティックミキサー中の液の線速は約 1.1 m/秒であった。スタティックミキサー 1 本目で 2 つの液が混合され、フマル

酸の結晶も L-アスパラギン酸の結晶も存在しない均質な溶液となった。この液のスタティックミキサーでの滞留時間は約 0.5 秒であった。この液を、冷却管を取り付けて減圧、還流できるようにした 10 L のフラスコに導入し、攪拌を継続したところ、約 15 分後に L-アスパラギン酸の結晶が析出し始めた。4 L の液が入ったところで液の導入を停止し、フラスコ内を 400 Torr まで減圧し、その後、1 分間に 3 Torr の割合で減圧すると、370 Torr 付近で L-アスパラギン酸が析出した液が沸騰を始めた。冷却管で蒸発した水を凝縮させてフラスコに戻しながらさらに 1 分間に 3 Torr の割合で減圧していった。約 2 時間後、50 Torr で L-アスパラギン酸が析出した液の温度が 40℃ になったので、フラスコ内を常圧にもどした。この状態で 30 分攪拌を継続し L-アスパラギン酸の結晶を完了させた。40℃ まで冷却し、遠心濾過によって L-アスパラギン酸結晶を分離し、水 100 ml で洗浄した。得られた L-アスパラギン酸の結晶は 753 g (含水率 7.0%) であり、乾燥後の重量は 700 g、純度は 99.7% であり、その形状は主に平均 500 μ m の長さの針状結晶であった。

【0081】

〔実施例 7〕

調製例 1 において調製したアスパルターゼ遺伝子組み換え体固定化アスパルターゼを 20% フマル酸アンモニウム溶液 (pH 8.3) に一晩浸漬したのち、その 500 ml をカラムに充填し、カラムの外部を発泡ポリスチレンの保温材で保温することによって反応器を断熱した。このカラムに、20℃ の恒温水槽で保温した 20℃ の表 4 に示す基質液を、断熱材を巻いたテフロンチューブを通して、毎時 5 L の速度 (LHSV = 10.0) で流通させ連続反応を行った。

【0082】

反応開始後 1 時間目に反応液の分析を行ったところ、反応生成物として、消費されたフマル酸とほぼ等モルの L-アスパラギン酸が生成し、その反応変換率は 99.2% であった。この反応液 10 L (重量 11.1 kg) を、冷却管を取り付けて減圧、還流できるようにした 20 L のフラスコに入れ、95℃ に加熱した。ここにフマル酸 1.00 kg を添加して攪拌すると、フマル酸結晶が完全に溶解した。均質な溶液となってからフラスコ内を 300 Torr まで減圧し、さらに 1

分間に 20 Torr の割合で減圧すると、すぐに L-アスパラギン酸が析出し、液が激しく沸騰を始めた。冷却管で蒸発した水を凝縮させてフラスコに戻しながらさらに 1 分間に 20 Torr の割合で減圧していくと、L-アスパラギン酸が析出した液が激しく沸騰した。約 20 分後、L-アスパラギン酸が析出した液の温度が 40℃ になったので、フラスコ内を常圧にもどした。この状態で 30 分攪拌を継続し L-アスパラギン酸の結晶を完了させた。析出した L-アスパラギン酸の結晶を遠心濾過器によって分離し、洗浄水 1 L で洗浄した。得られた L-アスパラギン酸の結晶は 2.18 kg (含水率 24%) であり、乾燥後の重量は 1.66 kg、純度は 98.8% であり、その形状は主に平均 30 μ m の針状結晶であった。

【0083】

この L-アスパラギン酸結晶を 1 L の水に懸濁して攪拌し、次いで遠心濾過して L-アスパラギン酸の結晶を分離した。得られた L-アスパラギン酸の結晶は 2.14 kg (含水率 23%) であり、乾燥後の重量は 1.65 kg、純度は 99.7% であった。

【比較例 1】

調製例 1 において調製したアスパルターゼ遺伝子組み換え体固定化アスパルターゼを 20% フマル酸アンモニウム溶液 (pH 8.3) に一晩浸漬したのち、その 500 ml をカラムに充填し、カラムの外部を発砲ポリスチレンの保温材で保温することによって反応器を断熱した。このカラムに、20℃ の恒温水槽で保温した 20℃ の表 4 に示す基質液を、断熱材を巻いたテフロンチューブを通して、毎時 5 L の速度 ($LHSV = 10.0$) で流通させ連続反応を行った。

【0084】

反応開始後 1 時間目に反応液の分析を行ったところ、反応生成物として、消費されたフマル酸とほぼ等モルの L-アスパラギン酸が生成し、その反応変換率は 99.2% であった。この反応液 10 L (重量 11.1 kg) を 20 L のフラスコに入れ、30℃ でフマル酸 1.00 kg を添加して攪拌すると、結晶が常に存在する状態で不均質のスラリーとなった。攪拌を 30 分継続したのち、析出した L-アスパラギン酸の結晶を遠心濾過器によって分離し、水 1 L で洗浄した。得

られたL-アスパラギン酸の結晶は2.33kg（含水率24.0％）であり、乾燥後の重量は1.77kg、純度は98.2％であり、その形状は主に10 μ m以下の微小な不定形結晶、及びその会合物であった。

【0085】

このL-アスパラギン酸結晶を1Lの水に懸濁して攪拌し、次いで遠心濾過してL-アスパラギン酸の結晶を分離した。得られたL-アスパラギン酸の結晶は2.08kg（含水率22.0％）であり、乾燥後の重量は1.62kg、純度は99.2％であった。

〔比較例2〕

調製例1において調製したアスパルターゼ遺伝子組み換え体固定化アスパルターゼを20％フマル酸アンモニウム溶液（pH8.3）に一晩浸漬したのち、その500mlをカラムに充填し、カラムの外部を発泡ポリスチレンの保温材で保温することによって反応器を断熱した。このカラムに、20℃の恒温水槽で保温した20℃の表4に示す基質液を、断熱材を巻いたテフロンチューブを通して、毎時5Lの速度（LHSV=10.0）で流通させ連続反応を行った。

【0086】

反応開始後1時間目に反応液の分析を行ったところ、反応生成物として、消費されたフマル酸とほぼ等モルのL-アスパラギン酸が生成し、その反応変換率は99.2％であった。この反応液10L（重量11.1kg）を、冷却管を取り付けて減圧、還流できるようにした20Lのフラスコに入れ、95℃に加熱した。ここにフマル酸1.00kgを添加して攪拌すると、フマル酸結晶が完全に溶解した。約3分攪拌を継続するとL-アスパラギン酸の結晶が析出し始めた。溶液の温度を95℃とし、その温度を30分保持した後、フラスコ内を400Torrまで減圧し、その後、1分間に3Torrの割合で減圧すると、370Torr付近でL-アスパラギン酸が析出した液が沸騰を始めた、冷却管で蒸発した水を凝縮させてフラスコに戻しながらさらに減圧度を1分間に3Torrの割合で高くしていった。約2時間半後、L-アスパラギン酸が析出した液の温度が20℃になったので、フラスコ内を常圧にもどした。この状態で30分攪拌を継続しL-アスパラギン酸の結晶を完了させた。析出したL-アスパラギン酸の結晶を遠心濾過器によ

って分離し、洗浄水 1 L で洗浄した。得られた L-アスパラギン酸の結晶は 2.10 kg (含水率 12%) であり、乾燥後の重量は 1.84 kg、純度は 98.5% であった。

【0087】

【発明の効果】

本発明により、純度の高い結晶性の L-アスパラギン酸を、煩雑な工程を要せず、優れた作業効率で製造することができる。

【0088】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Nippon Shokubai Co. Ltd.

<120> Process for Producing L-aspartic acid

<130> P98-0553

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1573

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: cDNA to mRNA of
aspartase gene derived from Escherichia coli K-12

<220>

<221> CDS

<222> (91)..(1524)

<400> 1

```

ggggataatc gtcggtcgaa aaacattcga aaccacatat attctgtgtg tttaaagcaa 60
atcattggca gcttgaaaaa gaaggttcac atg tca aac aac att cgt atc gaa 114
                                Met Ser Asn Asn Ile Arg Ile Glu
                                1             5

gaa gat ctg ttg ggt acc agg gaa gtt cca gct gat gcc tac tat ggt 162
Glu Asp Leu Leu Gly Thr Arg Glu Val Pro Ala Asp Ala Tyr Tyr Gly
    10             15             20

gtt cac act ctg aga gcg att gta aac ttc tat atc agc aac aac aaa 210
Val His Thr Leu Arg Ala Ile Val Asn Phe Tyr Ile Ser Asn Asn Lys
    25             30             35             40

atc agt gat att cct gaa ttt gtt cgc ggt atg gta atg gtt aaa aaa 258
Ile Ser Asp Ile Pro Glu Phe Val Arg Gly Met Val Met Val Lys Lys
                45             50             55

gcc gca gct atg gca aac aaa gag ctg caa acc att cct aaa agt gta 306
Ala Ala Ala Met Ala Asn Lys Glu Leu Gln Thr Ile Pro Lys Ser Val
                60             65             70

gcg aat gcc atc att gcc gca tgt gat gaa gtc ctg aac aac gga aaa 354
Ala Asn Ala Ile Ile Ala Ala Cys Asp Glu Val Leu Asn Asn Gly Lys
                75             80             85

tgc atg gat cag ttc ccg gta gac gtc tac cag ggc ggc gca ggt act 402
Cys Met Asp Gln Phe Pro Val Asp Val Tyr Gln Gly Gly Ala Gly Thr
                90             95             100

tcc gta aac atg aac acc aac gaa gtg ctg gcc aat atc ggt ctg gaa 450

```

特平 10-278579

Ser Val Asn Met Asn Thr Asn Glu Val Leu Ala Asn Ile Gly Leu Glu	
105 110 115 120	
ctg atg ggt cac caa aaa ggt gaa tat cag tac ctg aac ccg aac gac	498
Leu Met Gly His Gln Lys Gly Glu Tyr Gln Tyr Leu Asn Pro Asn Asp	
125 130 135	
cat gtt aac aaa tgt cag tcc act aac gac gcc tac ccg acc ggt ttc	546
His Val Asn Lys Cys Gln Ser Thr Asn Asp Ala Tyr Pro Thr Gly Phe	
140 145 150	
cgt atc gca gtt tac tct tcc ctg att aag ctg gta gat gcg att aac	594
Arg Ile Ala Val Tyr Ser Ser Leu Ile Lys Leu Val Asp Ala Ile Asn	
155 160 165	
caa ctg cgt gaa ggc ttt gaa cgt aaa gct gtc gaa ttc cag gac atc	642
Gln Leu Arg Glu Gly Phe Glu Arg Lys Ala Val Glu Phe Gln Asp Ile	
170 175 180	
ctg aaa atg ggt cgt acc cag ctg cag gac gca gta ccg atg acc ctc	690
Leu Lys Met Gly Arg Thr Gln Leu Gln Asp Ala Val Pro Met Thr Leu	
185 190 195 200	
ggc cag gaa ttc cgc gct ttc agc atc ctg ctg aaa gaa gaa gtg aaa	738
Gly Gln Glu Phe Arg Ala Phe Ser Ile Leu Leu Lys Glu Glu Val Lys	
205 210 215	
aac atc caa cgt acc gct gaa ctg ctg ctg gaa gtt aac ctt ggt gca	786
Asn Ile Gln Arg Thr Ala Glu Leu Leu Leu Glu Val Asn Leu Gly Ala	
220 225 230	
aca gca atc ggt act ggt ctg aac acg ccg aaa gag tac tct ccg ctg	834
Thr Ala Ile Gly Thr Gly Leu Asn Thr Pro Lys Glu Tyr Ser Pro Leu	
235 240 245	
gca gtg aaa aaa ctg gct gaa gtt act ggc ttc cca tgc gta ccg gct	882
Ala Val Lys Lys Leu Ala Glu Val Thr Gly Phe Pro Cys Val Pro Ala	
250 255 260	

410	415	420	
gac atc gtg ggt aaa atc tgt gcc gaa acc ggt aag agt gta cgt gaa			1410
Asp Ile Val Gly Lys Ile Cys Ala Glu Thr Gly Lys Ser Val Arg Glu			
425	430	435	440
gtc gtt ctg gaa cgc ggt ctg ttg act gaa gcg gaa ctt gac gat att			1458
Val Val Leu Glu Arg Gly Leu Leu Thr Glu Ala Glu Leu Asp Asp Ile			
445	450	455	
ttc tcc gta cag aat ctg atg cac ccg gct tac aaa gca aaa cgc tat			1506
Phe Ser Val Gln Asn Leu Met His Pro Ala Tyr Lys Ala Lys Arg Tyr			
460	465	470	
act gat gaa agc gaa cag taatcgtaca gggtagtaca aataaaaaag			1554
Thr Asp Glu Ser Glu Gln			
475			
gcacgtcaga tgacgtgcc			1573

<210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Designed
 oligonucleotide based on aspartase gene derived
 from Escherichia coli K-12

<400> 2
 ggataatcgt cggtcgaaaa 20

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide based on aspartase gene derived
from Escherichia coli K-12

<400> 3

cgtcatctga cgtgccttt

19

【0089】

【配列表フリーテキスト】

【0090】

【配列番号1】 大腸菌K-12株 (Escherichia coli K-12) 由来のアスパルターゼ遺伝子の mRNA に対する cDNA。

【0091】

【配列番号2及び3】 大腸菌K-12株 (Escherichia coli K-12) 由来のアスパルターゼ遺伝子に基づいて設計したオリゴヌクレオチド。

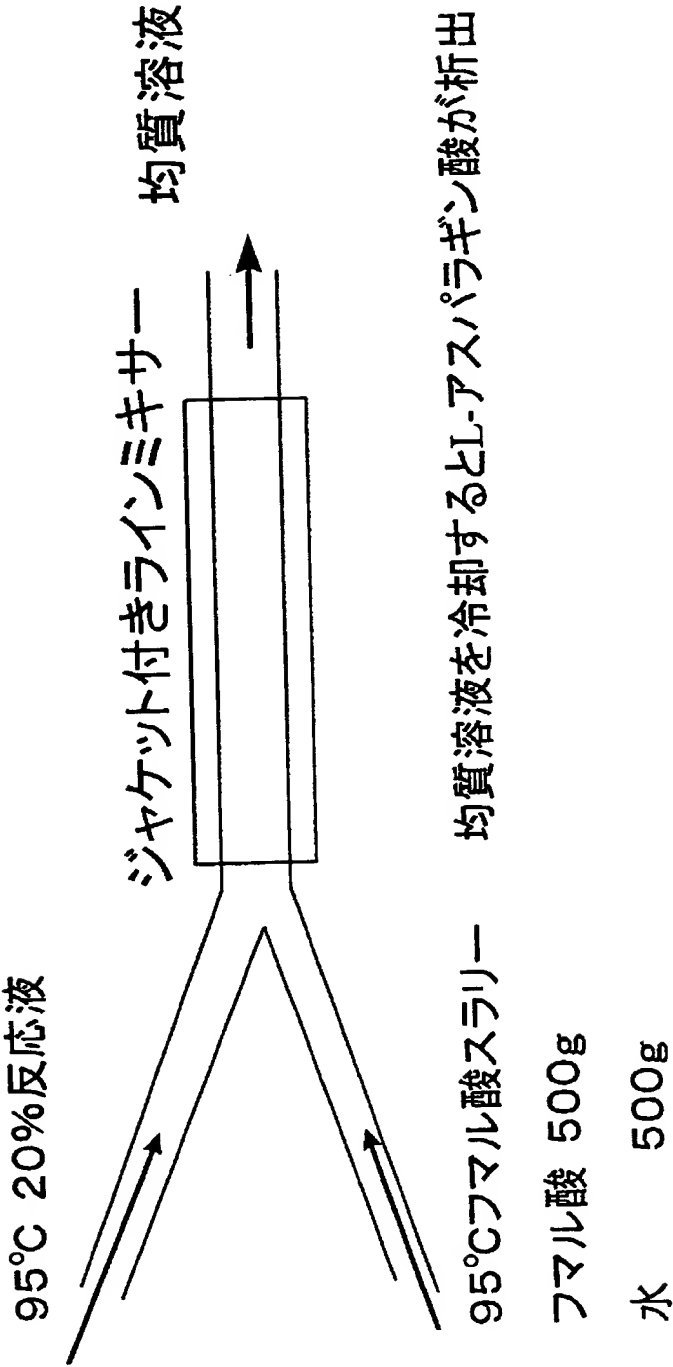
【図面の簡単な説明】

【図1】

連続式の混合管を用いて均質溶液を調製するための、具体的な装置を示す概略図である。

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 フマル酸アンモニウム塩溶液にアスパルターゼを作用させてL-アスパラギン酸アンモニウム塩溶液を得、該溶液からL-アスパラギン酸を結晶化してなるL-アスパラギン酸の製造方法において、前記L-アスパラギン酸アンモニウム塩溶液を50～130℃に加温後、該溶液に含まれるL-アスパラギン酸に対して0.4～0.8倍モルのフマル酸を添加し、せん断力をかけることによって一旦均質溶液とすることを特徴とするL-アスパラギン酸の製造方法。

【効果】 本発明により、純度の高い結晶性のL-アスパラギン酸を、煩雑な工程を要せず、優れた作業効率で製造することができる。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000004628

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区高麗橋4丁目1番1号

【氏名又は名称】 株式会社日本触媒

【代理人】 申請人

【識別番号】 100091096

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階平木国際特許事務所

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階平木国際特許事務所

【氏名又は名称】 石井 貞次

【選任した代理人】

【識別番号】 100101904

【住所又は居所】 埼玉県大宮市桜木町2丁目327番地 島村特許事務所

【氏名又は名称】 島村 直己

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000004628]

1. 変更年月日	1991年 6月11日
[変更理由]	名称変更
住 所	大阪府大阪市中央区高麗橋4丁目1番1号
氏 名	株式会社日本触媒